

Antibiotic resistance of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strains isolated from the patients with community respiratory tract infections

*Gr. Balan^{1,2}, O. Burduniuc², E. Ursu², E. Nicoara¹

¹Department of Epidemiology, Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy

²National Center of Public Health, Chisinau, the Republic of Moldova

*Corresponding author: gretabalan@mail.ru. Article received July 17, 2013; accepted September 15, 2013

Abstract

Community respiratory tract infections are common in clinical practice. Antimicrobial treatment should be promptly administered taking into account a probable etiology and local patterns of bacterial resistance according to the clinical presentation. Bacterial resistance is widespread, with large geographical variations related to antibiotics prescription. *S. pneumoniae* and *H. influenzae* are the most frequent pathogens responsible for respiratory tract infections etiology. We have analyzed 2554 *S. pneumoniae* strains and 156 *H. influenzae* strains isolated during 2010-2012, mainly from sputum (69.2% and 76.7% respectively of total isolated strains). We have observed a high proportion of strains of *S. pneumoniae* resistant to oxacillin (75.3%), to co-trimoxazole (62.9%) and to penicillin (62.8%). *H. influenzae* strains have been resistant to aztreonam in 92.1% of cases and to ampicillin – in 26%. Antibiotic susceptibility testing has been conducted through Kirby-Bauer technique. The interpretation of the results has been carried out in accordance with the criteria recommended by NCCLS. In the case of *H. influenzae* strains the environment Hemophilus test has been selected and in the case of *S. pneumoniae* strains the environment based on Agar Mueller Hinton blood has been used. For quality control in determining the sensitivity of strains, the strains of *S. pneumoniae* ATCC 49619 and *H. influenzae* ATCC 49247 have been used.

Key words: respiratory tract infections, antibiotic resistance, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.

Rezistența la antibiotice a tulpinilor de *Streptococcus pneumoniae* și *Haemophilus influenzae* izolate de la pacienții cu infecții comunitare ale tractului respirator

Introducere

Infecțiile respiratorii comunitare reprezintă una dintre cele mai frecvente patologii, cu care se confruntă medicul practician. În condițiile în care izolarea agenților responsabili ai acestora este dificil de realizat prin tehnici uzuale și necesită un interval de timp destul de mare, inițierea antibioticoterapiei se face fără a avea la dispoziție dovada bacteriologică a etiologiei, ținând cont de informațiile furnizate de studiile epidemiologice. Conform acestor studii, cei mai frecvenți germeni responsabili de infecțiile comunitare de tract respirator sunt *S. pneumoniae* și *H. influenzae*, reprezentând peste 50% din totalul germenilor izolați [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Alegerea

antibioticului trebuie să țină seama și de posibila prezență a fenomenului de rezistență bacteriană, un fenomen răspândit pe scară largă, cu variații geografice mari, care țin adesea de comportamentele locale de prescripție a antibioticelor [7, 8, 9]. Deși mecanismele de dobândire a rezistenței bacteriene sunt atât de complexe și presupun variații genetice specifice, expresia lor fenotipică este simplă și identificabilă pe baza testelor *in vitro* de determinare a sensibilității la antibiotice. Metodele calitative sau semicantitative sunt cele mai utilizate teste în practica medicală curentă în ghidarea antibioticoterapiei, fiind relativ ieftine și ușor de realizat. Prin convenție, o bacterie este considerată „rezistentă” la un antibiotic atunci

când CMI (Concentrația Minimă Inhibitorie) depășește o anumită concentrație critică predefinită. Aceste concentrații variază în funcție de potența antibioticului, de proprietățile farmacocinetice și farmacodinamice ale acestuia, de locația și tipul infecției, precum și de specia bacteriană și se stabilesc pe baza studiilor epidemiologice, efectuate pe un număr mare de tulpini [10, 11]. De-a lungul timpului, valorile CMI au suferit mai multe modificări, în funcție de evidențele apărute, în practica medicală utilizându-se valorile furnizate de autoritățile americane CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, vechiul NCCLS) [12]. Forul european EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) a inițiat în ultimii ani metodologii noi de determinare a CMI, care să țină cont de mai mulți parametri: evaluarea eficienței clinice a antibioticoterapiilor, proprietățile farmacodinamice și farmacochinetice ale antibioticelor și distribuția valorilor CMI, obținute prin analiza a peste 20 000 de tulpini, recoltate în ultimii 10 ani [13]. Prin decizii transparente și independente de interesele comerciale, multe valori ale CMI au fost revizuite și introduse în practică începând cu 2009, ceea ce a însemnat schimbări pe alocuri semnificative ale nivelurilor cunoscute de rezistență bacteriană.

Cunoașterea amplitudinii acestui fenomen într-o anumită populație reprezintă un factor important în decizia medicală a practicianului. Din acest motiv, sunt necesare studii epidemiologice de prevalență a rezistenței bacteriene într-un anumit teritoriu, pe baza cărora să se elaboreze ghiduri clinice de antibioticoterapie.

În țara noastră sunt puține studii de acest fel, informațiile disponibile fiind adesea furnizate de studii retrospective sau studii desfășurate într-un teritoriu dat, fără a putea fi extrapolate la întreaga țară.

Material și metode

În perioada 2010-2012, în laboratorul microbiologic al CNSP (Centrul Național de Sănătate Publică) s-a realizat identificarea și testarea sensibilității la antibiotice a 2554 de tulpini de *S. pneumoniae* și 156 de tulpini de *H. influenzae*, izolate de la pacienți cu pneumonii comunitare.

Etapele diagnosticului de laborator au inclus examinarea microscopică (la microscopul cu imersie a produsului patologic, frotiu Gram), izolarea germenilor prin cultivarea pe medii de cultură (în condițiile corespunzătoare multiplicării celor 2 specii pretențioase) pentru obținerea de colonii izolate și, în final, identificarea microorganismului prin verificarea mai multor caractere (morfologice, de cultură, biochimice și, eventual, caractere de patogenitate). Testarea sensibilității la antibiotice s-a realizat prin tehnica Kirby-Bauer conform standardului NCCLS. Interpretarea rezultatelor a fost efectuată conform criteriilor recomandate de NCCLS. În cazul tulpinilor de *H. influenzae* a fost ales mediul HTM (Hemophilus test mediu), iar în cazul tulpinilor de *S. pneumoniae* a fost utilizat mediul pe bază de Agar Mueller Hinton-sange. Pentru controlul de calitate a determinării sensibilității s-au utilizat tulpinile *S. pneumoniae* ATCC 49619 și *H. influenzae* ATCC 49247.

Rezultate și discuții

Studiul s-a desfășurat pe parcursul a trei ani consecutivi: 2010-2012. În toată această perioadă au fost izolate și identificate 2554 de tulpini de *S. pneumoniae* și 156 de *H. influenzae*. Cele 2554 de tulpini de *S. pneumoniae* au fost izolate astfel: 605 tulpini – în 2010, 872 de tulpini – în 2011 și 1077 de tulpini – în 2012. Cele 156 de tulpini de *H. influenzae* au fost izolate astfel: 40 de tulpini – în 2010, 75 de tulpini – în 2011 și 41 de tulpini – în 2012. Principalul produs patologic a fost sputa, într-un număr mic de cazuri fiind recoltate și alte produse. Majoritatea tulpinilor au fost izolate de la pacienți cu pneumonii comunitare.

Testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *S. pneumoniae* izolate (tab. 1) a demonstrat existența unei proporții însemnate de tulpini rezistenți la oxacilină, cotrimoxazol, penicilină, cefepim, ampicilină, kanamicină și ceftazidim. Dintre cefalosporine, cele mai înalte niveluri de rezistență s-au înregistrat la cefalosporinele din generația a IV-a (cefepim – 59,3%) și la cefalosporinele din generația a III-a (ceftazidim – 45,3%). O sensibilitate mai pronunțată s-a înregistrat față de cefalosporinele din I generație (cefalotină – 72,6% și cefazolină – 67,7%). În schimb, marea majoritate a tulpinilor s-a dovedit a fi sensibilă la imipenem (97,0%), rifampicină (85,0%), ofloxacină (84,7%), gentamicină (76,9%), și într-o proporție ceva mai mică la cloramfenicol (1294 de tulpini, respectiv 75,9%), și la cefalotină (72,6%). În ceea ce privește multirezistența bacteriană, numai 22 de tulpini (1,38%) au fost rezistenți și la amoxicilină, și la eritromicină și 88 de tulpini (5,5%) la penicilină și eritromicină simultan.

Studiul de față arată că tulpinile de *S. pneumoniae* prezintă rezistență variabilă la betalactamine. Astfel, proporția de tulpini sensibile la penicilină este de 37,2%. În schimb, proporția de germeni rezistenți la cefepim este mult mai mare: 59,3% rezistenți. Cele mai mici niveluri de rezistență la betalactamine au fost înregistrate pentru cefalotină și cefotaxim. În cazul macrolidelor, rezistența a fost mult mai mare comparativ cu țările din Europa [14], fiind de 45,4% pentru eritromicină. Niveluri mari de rezistență ale *S. pneumoniae* au fost înregistrate și în cazul cotrimoxazolului (62,9%), kanamicinei (46,9%) și tetraciclinei (43,67%), explicate în bună măsură prin excesul de prescripție în ultimele decade. În schimb marea majoritate a tulpinilor de *S. pneumoniae* au fost sensibile la cloramfenicol (75,9%), în concordanță cu slaba utilizare a lui în practică în ultimul timp.

Testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *H. influenzae* a demonstrat existența unei proporții însemnate de sușe rezistente la aztreonam, ampicilină, cotrimoxazol, amoxicilină-clavulanat și eritromicină. Astfel, marea majoritate a tulpinilor (92,1%) au prezentat rezistență la aztreonam, numai 7,9% tulpini fiind sensibile. Rezistență marcată la cotrimoxazol a fost identificată în 98 de cazuri (62,8%) din totalul de 156 de tulpini testate, numai 58 de tulpini (37,2%) fiind sensibile. Rate înalte de rezistență s-au identificat și în cazul preparatului combinat amoxicilină-clavulanat (58,5% rezistenți) și eritromicinei (57,4%). În schimb, marea majoritate a tulpinilor s-au dovedit a fi sensibile la gentamicină

Tabelul 1

Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de *S. pneumoniae* și *H. influenzae*

(S: sensibilitate, R: rezistență, n: număr tulpini testate)

Nr.	Preparatul antibacterian	<i>S. pneumoniae</i>					<i>H. influenzae</i>				
		Tulpini testate	S		R		Tulpini testate	S		R	
			n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)
1.	Oxacilină	1639	405	24,7	1234	75,3	-	-	-	-	-
2.	Penicilină	1982	738	37,2	1244	62,8	-	-	-	-	-
3.	Ampicilină	664	307	46,2	357	53,8	152	21	13,8	131	86,2
4.	Amoxicilină - clavulanat	1865	1226	65,7	639	34,3	65	27	41,5	38	58,5
5.	Cefazolină	1135	768	67,7	367	32,3	-	-	-	-	-
6.	Cefalotină	933	678	72,6	255	27,4	41	30	73,2	11	26,8
7.	Ceftazidim	841	460	54,7	381	45,3	-	-	-	-	-
8.	Cefoperazon	500	336	67,2	164	32,8	-	-	-	-	-
9.	Cefepim	314	128	40,7	186	59,3	-	-	-	-	-
10.	Cefotaxim	991	684	69,0	307	31,0	140	102	72,8	38	27,2
11.	Imipenem	166	161	97,0	5	3,0	77	60	77,9	17	22,1
12.	Aztreonam	-	-	-	-	-	76	6	7,9	70	92,1
13.	Gentamicină	2464	1895	76,9	569	23,1	60	59	98,3	1	1,7
14.	Kanamicină	823	437	53,1	386	46,9	-	-	-	-	-
15.	Streptomicină	1234	836	67,7	398	32,3	-	-	-	-	-
16.	Tetraciclină	1702	1077	63,3	625	36,7	98	89	90,8	9	9,2
17.	Rifampicină	1722	1464	85,0	258	15,0	153	130	84,9	23	15,1
18.	Ciprofloxacină	551	371	67,3	180	32,7	111	103	92,8	8	7,2
19.	Norfloxacină	115	81	70,4	34	29,6	38	31	81,6	7	18,4
20.	Ofloxacină	1351	1145	84,7	206	15,3	66	60	90,9	6	9,1
21.	Cotrimoxazol	1041	386	37,1	655	62,9	156	58	37,2	98	62,8
22.	Cloramfenicol	1704	1294	75,9	410	24,1	140	122	87,1	18	12,9
23.	Clindamicină	649	432	66,6	217	33,4	-	-	-	-	-
24.	Azitromicină	-	-	-	-	-	147	108	73,5	39	26,5
25.	Eritromicină	1589	868	54,6	721	45,4	54	23	42,6	31	57,4
26.	Cefexim	-	-	-	-	-	152	96	63,1	56	36,9
27.	Cefaclor	-	-	-	-	-	114	71	62,3	43	37,7
28.	Ceftriaxonă	-	-	-	-	-	144	103	71,5	41	28,5

(98,3%) și ciprofloxacină (92,8%) și într-o proporție ceva mai mică la ofloxacină (90,9%), tetraciclină (90,8%) și cloramfenicol (87,1%). De asemenea, rata rezistenței a fost joasă la rifampicină (15,1%) și norfloxacină (18,4%).

La macrolide marea majoritate a tulpinilor de *H. influenzae* au prezentat rezistență (57,4% la eritromicină), valori comparabile cu cele din țările Europene [15], comportament similar și în cazul sensibilității la ciprofloxacină (92,8%) și ofloxacină (90,9%).

Concluzii

Studiul prezentat furnizează date provenind de la pacienți cu infecții documentate, interpretarea lor fiind conformă cu ultimele recomandări europene asupra testării sensibilității la antibiotice. Tratamentul în infecțiile respiratorii trebuie să țină seama de rezistența dovedită a *S. pneumoniae* la betalactamine și macrolide (impunând deci utilizarea de doze

înalte de betalactamine) și de proporția mare de tulpini de *H. influenzae* rezistente la aztreonam, ampicilină și cotrimoxazol.

În acest moment, este important să diminuăm impactul social al fenomenului de rezistență multiplă la chimioterapiile antiinfecțioase, prin optimizarea utilizării antibioticelor existente, formularea strategiilor de reducere până la dispariție a tulpinilor bacteriene cu rezistență multiplă la acțiunea antibioticelor. Elaborarea și aplicarea acestora ar conduce, în timp, la modificarea biocenozei bacteriene nosocomiale și comunitare, cu reducerea tulpinilor rezistente.

References

1. Erard P. Community acquired pneumonia. A prospective outpatient study. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80:75-87.
2. Almirall J, Bolibar I, Vidal J, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. *Eur. Respir. J.* 2000;15:757-763.

3. Roson B, Carratala J, Dorca J, et al. Etiology, reasons for hospitalization, risk classes and outcomes of community acquired pneumonia in patients hospitalized on the basis of conventional admission criteria. *Clin. Infect. Dis.* 2001;33:158-165.
4. De Roux A, Ewig S, Garcia E, et al. Mixed community-acquired pneumonia in hospitalised patients *Eur. Respir. J.* 2006;27:795-800.
5. Etiologic Diagnosis of Adult Bacterial Pneumonia by Culture and PCR Applied to Respiratory Tract Samples. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006;643-645.
6. Sethi S, Evans N, Grant BJ, et al. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J.* 2002;347:465-471.
7. Perez-Trallero E, Garcia-de-la-Fuente C, Garcia-Rey C, et al. Geographical and ecological analysis of resistance, co-resistance and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1965-72.
8. Metlay JP. Antibacterial drug resistance: implications for the treatment of patients with community-acquired pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2004;18:777-90.
9. Bauer T, Ewig S, Marcos MA, et al. *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia: how important is drug resistance? *Med. Clin. North. Am.* 2001;85:1367-79.
10. Turnidge J, Paterson David L. Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clinical Microbiology Reviews.* 2007;391-408.
11. Turnidge J, Bordash G. Statistical methods for establishing quality control ranges for antibacterial agents in Clinical and Laboratory Standards Institute susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51:2483-2488.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. The twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
13. <http://www.eucast.org>
14. Morrissey I, Maher K, Williams L, et al. BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections in the UK and Ireland, 1999-2007. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(Suppl 2):ii97-103.
15. Garcia-Cobos S, Campos J, Lazaro E, et al. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2564-73.